

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-206423
(43)Date of publication of application : 07.08.1998

(51)Int.Cl. G01N 33/49
G01N 15/14
G01N 33/48
G01N 33/50

(21)Application number : 09-289619 (71)Applicant : TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD
(22)Date of filing : 22.10.1997 (72)Inventor : SAKATA TAKASHI
MIZUKAMI TOSHIHIRO
HATANAKA KAYO

(30)Priority
Priority number : 08309492 Priority date : 20.11.1996 Priority country : JP

(54) CLASSIFICATION COUNTING METHOD OF JUVENILE LEUKOCYTE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure juvenile leukocyte accurately and at the same time classify normal leukocyte and count the number of leukocytes by retaining juvenile leukocyte in live state and treating a hematological sample with a hemolysis agent for damaging other leukocytes.

SOLUTION: Juvenile leukocyte is retained in live state, a hematological sample is treated by a hemolysis agent for damaging the other leukocytes, and the damaged leukocytes are dyed by a fluorescent coloring matter for dyeing a damaged cell. Then, at least one scattered light of the treated blood and at least one fluorescence are measured and the leukocyte is classified and counted according to the intensity difference. The damaging of leukocyte is an operation for enabling the passage of the cell membrane of a coloring matter for preventing the cell membrane of live leukocyte from passing normally. More specifically, normally leukocyte is damaged, thus enabling the coloring matter from passing. As a hemolysis agent to be used, a solution containing a surface-active agent is used and further one containing a polyoxyethylene nonionic surface active agent expressed by an equation is preferably used.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.06.2004
[Date of sending the examiner's decision of

BEST AVAILABLE COPY

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-206423

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月7日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 33/49

G 0 1 N 33/49

H

15/14

15/14

C

33/48

33/48

M

33/50

33/50

K

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平9-289619

(71) 出願人 390014960

東亜医用電子株式会社

(22) 出願日 平成9年(1997)10月22日

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1

(31) 優先権主張番号 特願平8-309492

(72) 発明者 坂田 孝

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1 東亜医用電子株式会社内

(32) 優先日 平8(1996)11月20日

(72) 発明者 水上 利洋

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1 東亜医用電子株式会社内

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(72) 発明者 畑中 加代

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番地の1 東亜医用電子株式会社内

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

(54) 【発明の名称】 幼若白血球の分類計数法

(57) 【要約】

【課題】 高精度で幼若白血球を測定すると同時に、正常白血球の分類並びに白血球計数を行うことができる方法を提供する。

【解決手段】 以下の工程からなる幼若白血球の分類計数法：

(1) 幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で血液学的試料を処理する；

(2) 損傷を与えた前記白血球を、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色する；そして

(3) 上記の工程で処理した血球の少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの 蛍光を測定し、その強度差によって白血球を分類計数する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程からなる幼若白血球の分類計
数法：

- (1) 幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で血液学的試料を処理する；
- (2) 損傷を与えた前記白血球を、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色する；そして
- (3) 上記の工程で処理した血球の少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの 蛍光を測定し、その強度差によって白血球を分類計数する。

【請求項2】 幼若白血球の分類計数と同時に、正常白血球も検出し、全白血球数を計数する請求項1記載の方法。

【請求項3】 さらに正常白血球を少なくとも3つに分類計数する請求項2記載の方法。

*【請求項4】 溶血剤が以下の成分：

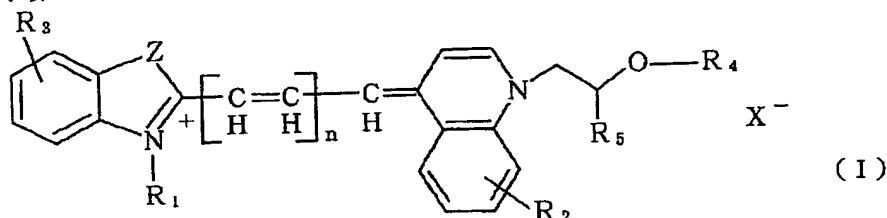
- (1) 幼若白血球の細胞質及び細胞膜を固定化するためのポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤；
- (2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤；
- (3) 幼若白血球の細胞質及び細胞膜を固定化するためのアミノ酸；および
- (4) 液のpHを5.0~9.0、浸透圧を150~600 mOsm/kgにする緩衝液、を含む請求項1~3のいずれかに記載の方法。

10

【請求項5】 蛍光色素が以下の群から選ばれる請求項1~4のいずれかに記載の方法：

- (1) 以下の式(1)の化合物：

【化1】



(式中、R₁は水素原子又は低級アルキル基；R₂及びR₃は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基；R₄は水素原子、アシル基又は低級アルキル基；R₅は水素原子、置換されていてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は低級アルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2；X⁻はアニオンである）；

(2) エチジウムブロマイド、プロビジウムアイオダイ
ド；

(3) エチジウム-アクリジンヘテロダイマー、エチジウムジアジド、エチジウムホモダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウムモノアジド、TOTO-1、TO-PRO-1、TOTO-3、TO-PRO-3。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、フローサイトメトリによる白血球の分類計数法に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査の分野において、白血球の分類計数を行うことは、疾患の診断を行う上で極めて有用な情報を得ることができる。通常、正常な末梢血液中の白血球には、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、好中球の5つが存在するのみである。しかしながら、例えば種々の血液疾患では、骨髓球、骨髓芽球等の幼若白血球が出現してくる。これらの幼若白血球の出現を検出することは、疾患を診断する上で極めて重要である。

【0003】従来、この目的には、血液の塗抹標本を作

製し適当な染色を施した後に顕微鏡で観察しながら分類計数することが一般的であった。一方、近年、フローサイトメータの原理を応用した種々の全自動白血球分類計数装置が提供されている。しかしながら、これらの装置は正常な白血球を高精度に分類計数することができるが、上述の幼若白血球を確実に検出し分類することはできなかった。

【0004】近年、RF/DC測定原理を用いて幼若白血球の出現を高精度で検出する試薬及び方法が提供されている(特開平6-273413号)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前記公報の方法は、特定の条件下では、正常白血球よりも幼若白血球の方が破壊されにくいという性質を利用して電氣的に測定を行うものである。また、散乱光情報によって測定することも示唆されている。しかし、この方法は、幼若白血球の検出のみを目的としており、幼若白血球の検出において優れた性能を有するが、幼若白血球の測定と同時に正常な白血球を分類計数することはできない。正常な白血球を分類計数するには、別途他の方法で行う必要がある。

【0006】特開平6-20792号には、白血球に標識物質が通過するだけの損傷を与えて血液を分析する方法が開示されているが、この方法は正常白血球にも幼若白血球にも同様の損傷を与えて分析する方法であり、幼若白血球と正常白血球の分離が必ずしも良くない。また、この方法で処理された幼若白血球は、標識物質として使用される色素に対して透過性であり、幼若白血球に

40

50

損傷を与えない方法を開示してはいない。

【0007】本発明は、高精度で幼若白血球を測定すると同時に、正常白血球の分類並びに白血球計数を行うことができる方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の工程：

(1) 幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で血液学的試料を処理する；

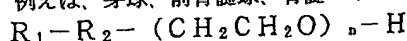
(2) 損傷を与えた前記白血球を、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色する；そして

(3) 上記の工程で処理した血球の少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定し、その強度差によって白血球を分類計数する、からなる幼若白血球の分類計数法を提供する。

【0009】本発明でいう白血球の損傷とは、通常、生きた白血球の細胞膜を通過しない色素の細胞膜透過を可能とする操作である。本発明では、正常白血球は損傷し、色素の透過を可能とし、一方幼若白血球は損傷せずに、つまり色素透過性のない状態にする。

【0010】通常の白血球細胞は、細胞内に不要の物質（例えば色素）を排除する物質排除機能を有している。

【0011】一方、特定の組成の溶血剤を細胞に作用させた場合、作用機序は明確ではないが、特定の細胞（例えば、正常白血球）の細胞膜脂質構成成分の一部を抽出（引き抜く）することにより、細胞膜に特定の物質が通過できるだけの細孔をあける。この結果、特定の細胞内に色素分子が入り込み染色することができる。一方、幼若白血球は、色素の透過を可能にするだけの細孔があげられないために（この状態を本発明中では生きた状態という）、色素で染色されない。なお、本発明でいう幼若白血球とは、通常骨髓に存在し、末梢血液に存在しない未成熟な細胞を指す。例えば、芽球、前骨髓球、骨髓*



（式中、 R_1 は炭素数10～25のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル

基； R_2 は $-O-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ または $-COO-$ ； n は10～40である）

【0014】特に、ポリオキシエチレン（20）ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン（15）オレイルエーテル、ポリオキシエチレン（16）オレイルエーテルが好適である。

【0015】ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤の濃度については、使用するものによって異なるが、前述のポリオキシエチレン（20）ラウリルエーテルでは、0.1～2.0 g/l（好ましくは0.5～1.5 g/l）、ポリオキシエチレン（15）オレイルエーテルでは、1～9 g/l（好ましくは3～7 g/l）、ポリオキシエチレン（16）オレイルエーテルでは、5～50 g/l（好ましくは15～35

* 球、後骨髓球をさす。前骨髓球、骨髓球、後骨髓球については、まとめて幼若顆粒球とすることもある。さらには、芽球以前の分化段階の細胞である、骨髓系幹細胞（CFU-GEMM）、好中球・マクロファージコロニー形成細胞（CFU-QM）、好酸球コロニー形成細胞（CFU-EOS）等の白血球系の造血前駆細胞も本発明の幼若白血球の範囲に含む。幼若白血球が染色されず、その他の白血球が染色されるようにするには下記の溶血剤と血液学的試料を混合することによって得られる。本発明でいう血液学的試料とは、主に末梢血液をさすが、この他にも、骨髓液、アフエレーシス等によって回収された血液成分を含む試料、又は腹腔液、尿試料等の白血球成分を含む生体試料も好適な試料である。

【0012】本発明で使用できる溶血剤としては、界面活性剤を含む水溶液が用いられ、さらには以下の構造式を有するポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤を含むものが好適に用いられる。特開平6-273413号に記載の溶血剤が好適である。前記公報に記載の溶血剤は、(1) 幼若白血球の細胞質及び細胞膜を固定化するためのポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤；

(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤；(3) 幼若白血球の細胞質及び細胞膜を固定化するためのアミノ酸；および(4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/kgにする緩衝液、電気伝導度を6.0～9.0 mS/cmにする緩衝液を含む。本発明では、光学的に測定を行うため、電気伝導度の影響はほとんどなく、従って電気伝導度については上記の範囲に限定されない。

【0013】前記ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤は、以下の構造式を有するものが使用できる：

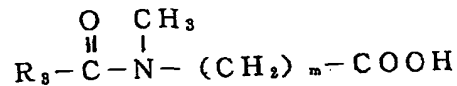
【化2】

q/l)の範囲で使用できる。ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤は、疎水性基の炭素数が同じであれば、 n の数小さくなるほど細胞を損傷する力が強く、 n が大きくなるほど弱くなる。また、 n の数が同じであれば、疎水性基の炭素数が小さくなるにつれて細胞を損傷する力が強くなる。その点を考慮し、上記の値を目安にして、必要な界面活性剤濃度は実験により簡単に求めることができる。

【0016】また、前記可溶化剤は以下のものから選ぶことができる：

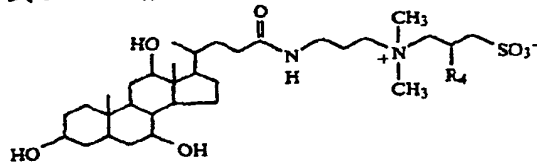
【化3】

(1) 以下の式のサルコシン誘導体あるいはその塩：



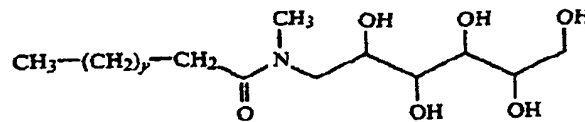
(式中、R₃は炭素数10～22のアルキル基；mは1～5である)

(2) 以下の式のコール酸誘導体：



(式中、Rは水素原子または水酸基)

(3) 以下の式のメチルグルカンアミド



(式中、yは5～7である)

【0017】可溶化剤の好ましい濃度は、サルコシン酸誘導体あるいはその塩では、0.2～2.0 g/l、コール酸誘導体では、0.1～0.5 g/l、メチルグルカンアミドでは、1.0～8.0 g/lである。具体的には、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ラウロイルメチルβ-アラニンナトリウム、ラウロイルサルコシン、CHAPS (3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)、CHAPSO (3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート)、MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA10 (デカノイル-N-メチルグルカミド)等が好適に使用できる。その他に、n-オクチルβ-グルコシド、シュークロースモノカプレートやN-ホルミルメチルロイシルアラニン等が使用でき、その好ましい濃度は、0.01～50.0 g/lである。

【0018】また、アミノ酸は、タンパク質を構成するアミノ酸を使用でき、グルタミン酸、バリンや、特にメチオニン、シスチン及びシステイン等のような含硫アミノ酸が好適であり、メチオニンが最も好適である。使用量は、1～50 g/lの範囲で使用でき、グルタミン酸の場合は8～12 g/lが好適であり、メチオニンの場合には、16～24 g/lが好適である。

【0019】緩衝液は、HEPES等のGood緩衝液やリン酸緩衝液等に水酸化ナトリウム等のpH調整剤を加え、必要があれば、塩化ナトリウムのような浸透圧調整剤をさらに加え、pHを5.0～9.0、浸透圧を150～600

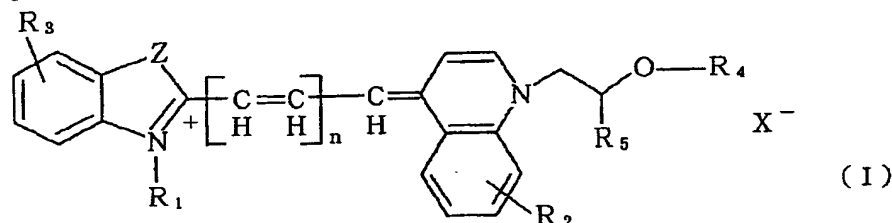
mOsm/kgとするのが好ましい。

【0020】本発明で使用される色素は、損傷を与えた細胞又は幼若白血球のうちいずれか一方を染色できればよいが、好ましくは損傷を与えた細胞を染色できる色素である。損傷を与えた細胞を染色するための色素とは、生細胞に対する透過性が低い色素である。一般に生細胞は、細胞膜によって細胞外と区別されており、細胞膜は細胞が必要としない物質を透過させないように、物質選択的である。例えば、細胞膜透過性の低い色素の例としては、トリパンブルーが挙げられる。これらの色素は一般的に酸性官能基、例えばカルボキシル基、硫酸基等を有する酸性色素である。これらの色素は生細胞を染色せずに、細胞膜に損傷を受けた細胞を染色することができる。しかしながら、酸性色素は血小板等の白血球以外の成分を染色する傾向にあるため本発明に使用するには好適でない。本発明の目的を達成するには、白血球に特異的に存在する成分を染色する方が好適である。この染色対象としては、細胞核、特にDNAに対して特異性を有する色素あるいはRNAに特異性を有する色素が特に好適である。この目的には、いくつかのカチオン性色素が好適である。

【0021】一般的にカチオン性色素は、生きた細胞の細胞膜を通過し、細胞内構成成分を染色する。しかしながら、特定のカチオン性色素（例えば、エチジウムブロマイド、プロビジウムアイオダイド等）は、生細胞を透過せず、損傷細胞のみを染色することがよく知られている。本発明の目的に使用できる色素は特に限定されるものではないが、具体例としては、先のエチジウムブロマ

7
イド、プロビジウムアイオダイド、さらにモレキュラー
ブロープ社より販売されているエチジウム-アクリジン
ヘテロダイマー、エチジウムジアジド、エチジウムホモ
ダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウ
ムモノアジド、TOTO-1、TO-PRO-1、TO
TO-3、TO-PRO-3 (Handbook of Fluorescen*

* t Probes and Research Chemicals 5th Edition 1992-19
94: MOLECULAR PROBES, INC. 1992 に記載) 等に加え、
さらに、光源としてHe-Ne、赤色半導体レーザを使
用する場合に好適な色素として、以下の構造式(1)で
示される色素が使用できることを見いだした:
[化4]



(式中、R₁は水素原子又は低級アルキル基；R₂及びR₃は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基；R₄は水素原子、アシル基又は低級アルキル基；R₅は水素原子、置換されていてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は低級アルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2；X⁻はアニオンである)。

【0022】式(1)のR₁における低級アルキル基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、ter-ブチル、ペンチル、ヘキシル基が挙げられ、中でもメチル基、エチル基が好ましい。

【0023】R₂及びR₃における低級アルキル基は上記と同様であり、低級アルコキシ基としては、炭素数1～6のアルコキシを意味し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ等が挙げられ、中でもメトキシ基、エトキシ基が好ましい。なお、R₂及びR₃は水素原子であることがより好ましい。

【0024】R₄におけるアシル基とは、脂肪族カルボン酸から誘導されたアシル基が好ましく、例えば、アセチル、プロピオニル等が挙げられ、中でもアセチル基が好ましい。また、低級アルキル基は上記と同様である。

20 チル基が好ましい。

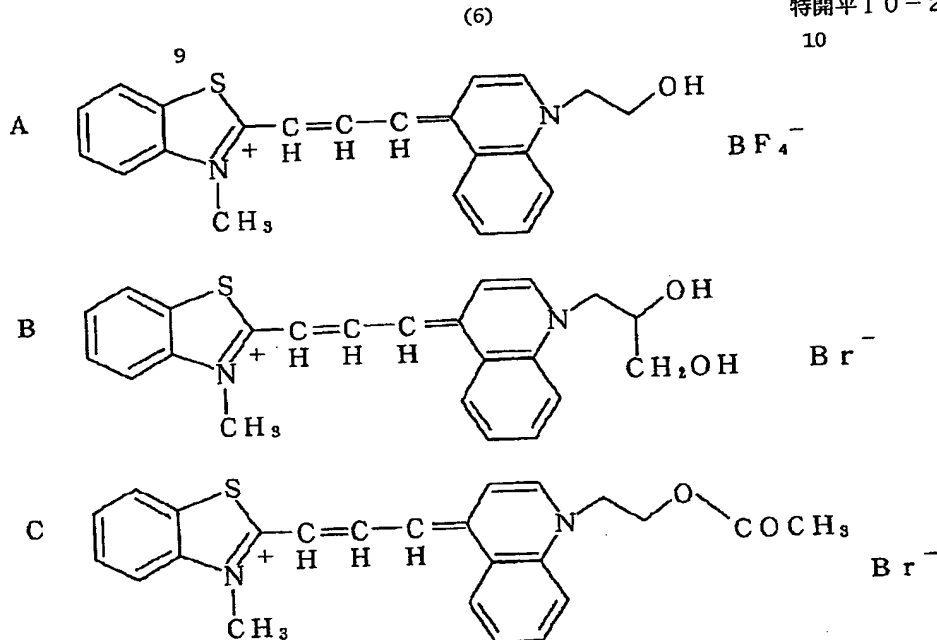
【0025】R₅における低級アルキル基は上記と同様であり、置換されていてもよい低級アルキル基とは、1～3個の水酸基、ハロゲン原子(フッ素、塩素、臭素又はヨウ素)等で置換されていてもよい低級アルキル基を意味し、中でも1個の水酸基で置換されたメチル基、エチル基が好ましい。

【0026】Zにおける低級アルキル基とは上記と同様であり、Zとしては硫黄原子であることが好ましい。

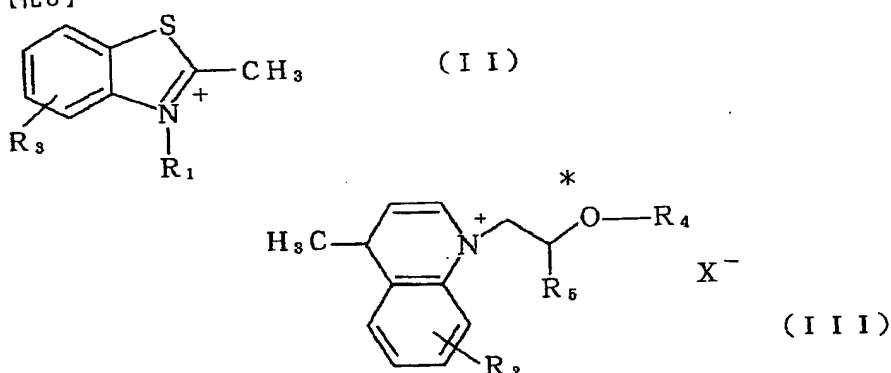
【0027】X⁻におけるアニオンは、ハロゲンイオン(フッ素、塩素、臭素又はヨウ素イオン)、ハロゲン化ホウ素イオン(BF₄⁻、BCl₄⁻、BBr₄⁻等)、リン化合物イオン、ハロゲン酸素酸イオン、フルオロ硫酸イオン、メチル硫酸イオン、芳香環にハロゲンあるいはハロゲンをもつアルキル基を置換基として有するテトラフェニルホウ素化合物イオン等が挙げられる。中でも、臭素イオン又はBF₄⁻が好ましい。

【0028】上記式(1)の色素の具体的な例としては、以下の色素A、色素Bおよび色素Cが好適である。これらの色素A、色素B、色素Cについては、特開平9-104683号に詳細な合成方法が記載されている。

[化5]



【0029】合成方法の一例を挙げると、式(I)においてn=1の化合物は、例えば、式(II) 20*で表される化合物と、N、N-ジ置換ホルムアミジンとを反応させ、その生成物に式(III)【化7】



で表されるキノリン誘導体を反応させ、次いで、ホウフッ化ナトリウムと処理することにより得ることができる。

【0030】また、式(I)の化合物のうち、n=2の化合物は、上記反応で、N、N-ジ置換ホルムアミジンを用いる代わりに、例えば、マロンアルデヒドビス(フェニルイミン)塩を反応させることによって得ることができる。

【0031】また、前述のMOLECULAR PROBES, INC.のハンドブックにも幾つかの色素が記載されている。上述の色素は例示であって、これによって本発明が制限されるものではない。

【0032】測定用試料の作製には、上述の溶血剤と色素を含む溶液と血液試料を混合するだけでよい。あるいは、色素をエチレングリコール等の水溶性有機溶媒に溶解しておき、使用時に溶血剤と混合してもよい。このよ

うにすることによって、色素の保存安定性を高めることができる。色素濃度は、使用する色素に応じて適宜決定でき、当業者は容易に実験的に求めることができる。例えば、エチジウムブロマイドの場合、0.01~100 ppm、好ましくは0.1~30 ppmが使用できる。

40 【0033】また、血液試料と、色素を含む溶血剤溶液との混合比は、1:10~1:1000、反応温度は20~40℃、反応時間5秒~5分間で好適に実施できる。反応温度が高いときは反応時間を短くすることが望ましい。

【0034】作製した試料を測定するには、例えば図1に示すような構造のフローサイトメータが使用できる。市販のフローサイトメータ(例えば、FACSscan、ベクトンディッキンソン社)が使用でき、特に改良の必要はない。光源は、使用する蛍光色素の励起波長に合わせ

【0035】散乱光の検出は、前方散乱光（低角または高角）でも側方散乱光でも構わない。

【0036】本発明を以下の実施例によって説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。

*【0037】

【実施例】

実施例1

*

測定用試薬：

ポリオキシエチレン（16）オレイルエーテル	24.0g/l
N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	1.5g/l
DL-メチオニン	20.0g/l
HEPES	12.0g/l
1N-NaOH	0.3g/l
NaCl	4.0g/l
色素A	3.0mg/l

【0038】上述の試薬1mlと血液33μlを混合し、10秒後にフローサイトメータで側方散乱光、赤蛍光を測定した（光源：赤色半導体レーザー、波長：633nm）。

【0039】得られた結果を図2（A～C）に示す。Aは正常な血液の測定結果、Bは幼若顆粒球の出現している血液、Cは幼若顆粒球、芽球の出現している検体の測定結果を示す。図中、Lymphはリンパ球、Monoは単球、Granは顆粒球、IGは幼若顆粒球、Blastは芽球を示す。

【0040】図2のAでは、白血球がリンパ球、単球、顆粒球に3分画されている。Bでは、正常の3分画に加えて、幼若顆粒球が分画される。Cでは、正常の3分画に加えて、幼若顆粒球と芽球が分画される。

【0041】次に、本発明の測定法による測定結果と従来法による測定結果を比較して相関分析を求めた。従来法は多項目自動血球分析装置（SE-9000、東亜医用電子株式会社）で測定した。

【0042】得られた結果を図3（A～D）に示す。リンパ球（A）、単球（B）および顆粒球（C）の割合、ならびに白血球の総数（WBC：図3ではDで示す）のいずれにおいても従来法と本発明の方法の結果に良好な相関が得られた。なお、SE-9000の顆粒球は、NEUT（好中球）+EO（好酸球）+BA（好塩基球）で求めた。

【0043】実施例2

実施例1と同じ試薬を用いて、G-CSF投与後の造血前駆細胞の出現した検体をフローサイトメータで側方散乱光と赤蛍光を測定した。結果を図4に示す。幼若白血球の領域である蛍光強度の低い領域に細胞集団が認められた。

【0044】また、造血前駆細胞がCD34陽性である性質を利用して、造血前駆細胞を分離して測定を行っ

た。まず、血液成分分析装置により単核球に富む試料を調製し、次に、抗CD34モノクローナル抗体（Becton Dickinson Immunocytometry System Co., Ltd.社製）を結合させた磁気ビーズ（Dynabeads™；DYNALとして市販されている）と反応させ、次いで磁気細胞分離器（Isolex™；Baxter Co., Ltd.）を用いてCD34陽性の造血前駆細胞を分離した。次に、酵素（キモバイン）処理を行ってCD34陽性細胞を磁気ビーズから分離した。

【0045】このようにして調製した試料を同じ試薬を用いて、フローサイトメータで側方散乱光と赤蛍光を測定した。結果を図5に示す。同様に幼若白血球の領域である蛍光強度の低い領域に細胞集団が認められた。

【0046】

【発明の効果】本発明によれば、溶血剤による処理に加え、さらに損傷細胞を染色できる色素で染色し、散乱光と蛍光とを組み合わせることで測定することにより、従来法では不可能であった正常白血球の分類計数と幼若白血球の分類計数が同時に可能になり、ならびに白血球数計数が一つの系で可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に使用できるフローサイトメータの概略図を示す。

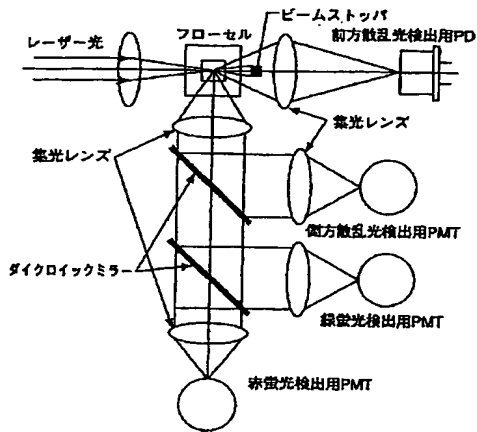
【図2】本発明の方法を用いて測定した結果を示す。Aは正常な血液の測定血液、Bは幼若顆粒球の出現している血液、Cは幼若顆粒球、芽球の出現している検体の測定結果である。

【図3】本発明の測定法による測定結果と従来法による測定結果を比較して相関分析結果を示す。

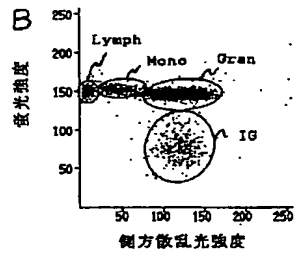
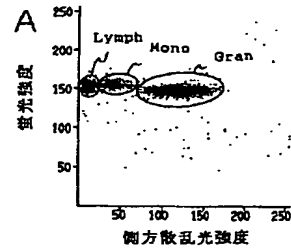
【図4】G-CSF投与後の造血前駆細胞の出現した検体を本発明の方法を用いて測定した結果を示す。

【図5】CD34陽性の造血前駆細胞を分離した後、本発明の方法を用いて測定した結果を示す。

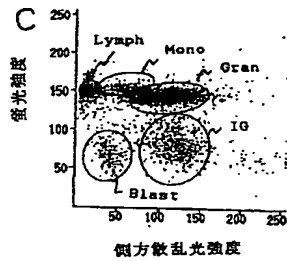
【図1】



【図2】

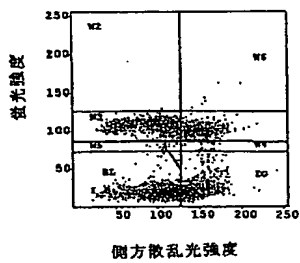


本発明	目視200カウント
IG 3.5%	骨髄球 2%
	後骨髄球 2%

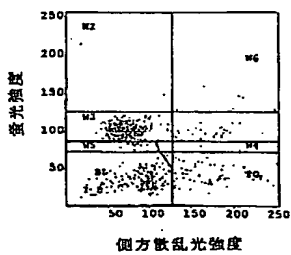


本発明	目視200カウント
IG 7.5%	骨髄球 3%
	後骨髄球 4%
Blast 2%	骨髄芽球 2%

【図4】



【図5】



【図3】

